

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES  
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum  
Internationales Büro(43) Internationales Veröffentlichungsdatum  
11. Januar 2001 (11.01.2001)

PCT

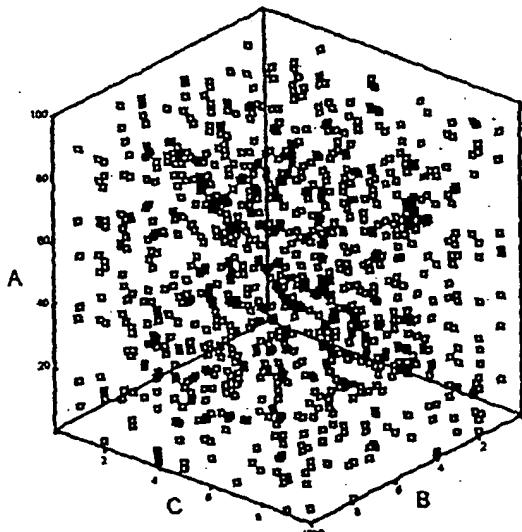
(10) Internationale Veröffentlichungsnummer  
WO 01/02848 A1

(51) Internationale Patentklassifikation<sup>7</sup>: G01N 30/46 (72) Erfinder; und  
 (21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE00/02154 (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): HORN, Anton [DE/DE]; Pennickental 4, D-07749 Jena (DE).  
 (22) Internationales Anmeldedatum: 4. Juli 2000 (04.07.2000) KREUSCHI, Stefan [DE/DE]; Freiligrathstrasse 90, D-07743 Jena (DE).  
 (25) Einreichungssprache: Deutsch (74) Anwalt: JENOPTIK AG; Gewerbliche Schutzrechte, D-07739 Jena (DE).  
 (26) Veröffentlichungssprache: Deutsch  
 (30) Angaben zur Priorität: 199 32 270.8 5. Juli 1999 (05.07.1999) DE (81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: METHOD FOR THE MULTI-DIMENSIONAL ANALYSIS OF A PROTEOME

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR MEHRDIMENSIONALEN ANALYSE EINES PROTEOMS



WO 01/02848 A1

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur mehrdimensionalen Analyse eines Proteoms. Das Verfahren findet in der Biochemie, in der Biotechnologie, in der Medizin sowie in der Pharmazeutischen Industrie Verwendung und dient u.a. zu diagnostischen Zwecken und zur Entwicklung biologisch wirksamer Substanzen. Der Erfindung liegt die Aufgabe zu Grunde, die Quantifikation und Identifikation der Proteine eines Proteoms zu verbessern, zu erleichtern und für bestimmte Proteine überhaupt erst zu ermöglichen. Erfindungsgemäß werden die Proteine des Proteoms unter standardisierten Bedingungen einer Vielzahl n verschiedener Trennverfahren derart unterworfen, daß jeweils jede der in einem Trennschritt erhaltenen flüssigen Fraktionen m<sub>1</sub> in einem darauf folgenden Trennschritt m<sub>2</sub> flüssige Fraktionen liefert, wobei nach n Trennschritten m<sub>1</sub>\* m<sub>2</sub>\* ... m<sub>n</sub> = M flüssige Fraktionen vorliegen, die mit o verschiedenen Analyseverfahren qualitativ und/oder quantitativ durch an sich bekannte Identifikationsverfahren identifiziert und durch ebenfalls an sich bekannte Quantifikationsverfahren quantitativ bestimmt werden, so daß nach Zusammenfügen der Analysedaten in einer Datenbank ein n-dimensionales Abbild des Proteoms, charakterisiert durch Identifikatoren und Quantifikatoren sowie durch die Lage im n-dimensionalen Netz, gewonnen wird.



(84) Bestimmungsstaaten (regional): ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

— Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden Frist; Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen eintreffen.

Veröffentlicht:

— Mit internationalem Recherchenbericht.

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes, und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

## Beschreibung der Erfindung

### **Verfahren zur mehrdimensionalen Analyse eines Proteoms**

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur mehrdimensionalen Analyse eines Proteoms, bei dem das biologische Gewebe mit dem zu analysierenden Proteom aufgeschlossen und die zu dem Proteom gehörenden Proteine getrennt sowie quantitativ bestimmt und identifiziert werden. Das Verfahren findet in der Biochemie, in der Biotechnologie, in der Medizin sowie in der Pharmazeutischen Industrie Verwendung und dient u. a. zu diagnostischen Zwecken und zur Entwicklung biologisch wirksamer Substanzen. Spezielle Einsatzgebiete eröffnen sich in der Grundlagenforschung, beispielsweise für die Klärung entwicklungsbiologischer oder zelldifferenzierender Fragestellungen, sowie in der angewandten Forschung für das Screening von Wirkstoffbanken, für die Entwicklung und Optimierung biologisch aktiver Substanzen oder für die Differenzierung zwischen normalen und pathogenen Zuständen in Organismen.

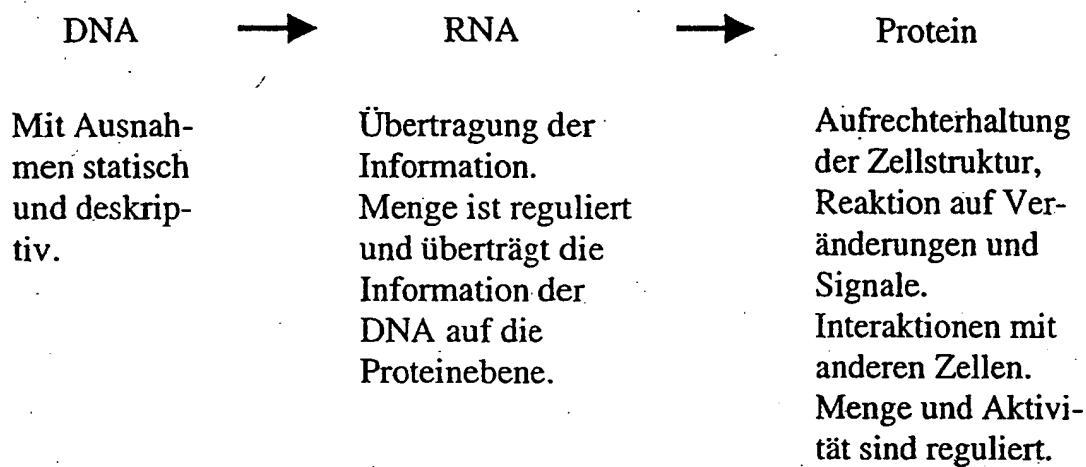
In der jüngeren Vergangenheit wurden Genome von Organismen ganz oder zu großen Teilen sequenziert [Fraser CM et al.: The minimal gene complement of *Mycoplasma genitalium*, *Science*, 1995, Oct 20, 270 (5235), 397-403; Fleischmann RD et al.: Whole-genome random sequencing and assembly of *Haemophilus influenzae* Rd. *Science*, 1995, Jul 28, 269 (5223), 496-512; Blattner FR et al.: The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12, *Science*, 1997, Sep 5, 277 (5331), 1453-74; Goffeau A et al.: Life with 6000 genes, *Science*, 1996, Oct 25, 274 (5287), 546, 563-7]. Noch intensiver wurden cDNA-Abschnitte sequenziert [Clark MS: Comparative genomics: the key to understanding the Human Genome Project, *Bioessays*, 1999, Feb,

21 (2), 121-30; Evans MJ et al.: Gene trapping and functional genomics, Trends Genet, 1997 Sep, 13 (9), 370-4]. Die Sequenzdaten sind in Datenbanken gespeichert. Die Aufklärung des Genoms eines Organismus führt letztlich "nur" zur Kenntnis des relativ statischen Informationsgehaltes des genetischen Materials für diesen Organismus. Mit den Sequenzen der cDNA- ist es prinzipiell möglich, Expressionslevel der mRNA auch zellspezifisch und umweltspezifisch zu ermitteln und damit ein Genexpressionsmuster der RNA zu erhalten.

Aus einem Gen des Genoms können

- a) durch verschiedene Prozesse, unterschiedliche mRNA-Sorten entstehen, die für divergente Proteine kodieren, und
- b) die aus ihnen entstehenden Proteine können durch posttranskriptionale Modifikation eine Vielzahl außerordentlich unterschiedlich funktionierender Proteine bilden. Zu den bisher bekannten Modifikationen gehören Phosphorylierung und Dephosphorylierung, limitierte Proteolyse, Acetylierung, Methylierung, Adenylierung, Sulfatierung, Glykosylierung [McDonald LJ et al.: Enzymatic and nonenzymatic ADP-ribosylation of cysteine, Mol Cell Biochem, 1994 Sep, 138 (1-2), 221-6; Baenziger JU: Protein-specific glycosyltransferases: how and why they do it!, FASEB J, 1994 Oct, 8 (13), 1019-25; Mimnaugh EG et al.: The measurement of ubiquitin and ubiquitinated proteins, Electrophoresis, 1999 Feb, 20 (2), 418-28; Davis PJ et al.: Protein modification by thermal processing, Allergy, 1998, 53 (46 Suppl), 102-5]. Die exprimierten und modifizierten Proteine ergeben aber letztendlich das Muster, welches die Zelldifferenzierung und die Reaktion auf innere und äußere Einflüsse von Zellen beschreibt. Am augenfälligsten ist die eingeschränkte Bedeutung der Kenntnis des Genoms für die Realisierung eines definierten biologischen Zustandes, wenn man die unterschiedlichen Zellen in verschiedenen Organen und innerhalb eines

Organs vergleicht. Beispielsweise haben eine Leberparanchymzelle, eine Nervenzelle des Gehirns und eine Mukosazelle des Darms den selben Satz genetischer Information, aber völlig unterschiedliche Funktion, die durch die Regulation der Expression des Genoms in diesen Zellen und die Regulation des Enzym- und Proteinmusters innerhalb der Zellen sowie der verschiedenen Gewebe hervorgerufen wird.



Die Begriffsbestimmung des "Proteoms", erfolgte erst 1996 [Friedrich GA: Moving beyond the genome projects, Nat Biotechnol, 1996 Oct, 14 (10), 1234-7].

Das Proteom, das heißt die Gesamtheit aller Proteine in einer Zelle mit einem bestimmten Entwicklungsstand und unter definierten Umweltbedingungen, stellt eine sehr viel dynamischere Repräsentation des physiologischen Zustandes von Zellen, Organen und Organismen dar. Die Proteomanalytik untersucht, welche Teile des Genoms unter definierten, zellspezifischen Bedingungen exprimiert und modifiziert werden. Dies führte zu schnell anwachsendem Interesse an diesem Gebiet, mit der Folge von ansteigenden Publikationszahlen (PubMed query Suchbegriff: Proteome; Suche 1 Jahr zurück: 64 Einträge, 2 Jahre zurück: 99 Einträge, 5 Jahre zurück: 122 Einträge), Kongressen und Veranstaltungen zu dieser Thematik.

Um ein quantifizierbares "Bild" eines Proteoms zu erhalten, wird gegenwärtig folgendermaßen verfahren: In einem ersten Schritt müssen die biologischen Materialien aufgeschlossen und homogenisiert werden (mit Ausnahmen: z. B. beim Serum liegen sie in einer homogenen Lösung vor). Im zweiten Schritt erfolgt die Trennung der Proteine, im dritten die Identifizierung und im vierten die Auswertung der erhaltenen Daten [Ben RH et al.: Two dimensional electrophoresis, The state of the art and future directions, Proteome Research, New frontiers in functionel genomics, Springer 1997 Chap, 2, 13-33].

### 1. Aufschluß

Hierfür werden bekannte Verfahren und Anordnungen aus der Biochemie eingesetzt, wie beispielsweise Scherkrafthomogenisatoren, Ultraschallbehandlung, Hochdruckpressen. Die Schwierigkeit besteht in einem quantitativen und möglichst die Funktion der Proteine nicht zerstörenden Aufschluß, denn nur quantitativ aufgeschlossene Proteine liefern in dem nachfolgenden zweiten Schritt (Trennung und Detektion der Proteine) ein reales Bild des Probenmaterials [Rabilloud T: Solubilization of proteins in 2-D electrophoresis, An outline, Methods Mol Biol, 1999, 112, 9-19; Rabilloud T et al.: Improvement of the solubilization of proteins in two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients, Electrophoresis, 1997 Mar-Apr, 18 (3-4), 307-16; Staudenmann W et al.: Sample handling for proteome analysis, Electrophoresis, 1998 May, 19 (6), 901-8].

### 2. Trennung und Detektion

Für die Trennung der Proteine des Proteoms wird gegenwärtig essentiell die zweidimensionale Gelelektrophorese verwendet. Es sind erste Versuche mit einer zweidimensionalen HPLC unternommen worden. Diese haben jedoch bisher nicht die Trennschärfe der zweidimensionalen Elektrophorese erreicht

[Opiteck GJ, et al. Comprehensive two-dimensional high-performance liquid chromatography for the isolation of overexpressed proteins and proteome mapping. *Anal Biochem*. 1998 May 1;258(2):349-61.]. Die erste Dimension der zweidimensionalen Elektrophorese ist eine Trennung nach dem isoelektrischen Punkt, also letztendlich nach den Ladungseigenschaften eines Proteins. In der zweiten Dimension wird nach der Größe der Proteine in einem denaturierenden Natriumdodecylsulfat-Gel getrennt. Diese Trenntechnik ist seit etwa seit 20 Jahren bekannt. Ein Vorteil der 2-D-Elektrophorese liegt in der Möglichkeit, eine relativ große Zahl von Proteinen auf einer Fläche mit hoher Auflösung zu trennen. Man geht gegenwärtig davon aus, daß ca. 10.000 Proteine in einem solchen zweidimensionalen Gel nachgewiesen werden können [Klose J et al.: Two-dimensional electrophoresis of proteins: an updated protocol and implications for a functional analysis of the genome, *Electrophoresis*, 1995, Jun 16 (6), 1034-59]. Ein weiterer Vorteil liegt darin, daß man durch radioaktive Markierung oder nach der Anfärbung mit ebenfalls bekannten Techniken in der Lage ist, die getrennten Proteine zu quantifizieren. Diese Quantifizierungsmethoden sind proteinspezifisch, haben einen eingeschränkten dynamischen Nachweisbereich, sind in der Regel schwer automatisierbar und sind abhängig von den jeweiligen (oft nicht vollständig zu reproduzierenden) Einsatzbedingungen [James P: Of genomes and proteomes, *Biochem Biophys Res Commun*, 1997, Feb 3, 231 (1), 1-6]. Sie sind nur für relative Bestimmungen geeignet. Die Quantifizierung über immunologische Eigenschaften ist problematisch, weil dafür Blottechniken mit eingeschränkter quantitativer Aussagekraft eingesetzt werden müssen.

Das Ergebnis ist ein fingerabdruckähnliches Bild, welches das Proteom charakterisiert.

Die Nachteile dieser Trenntechnik sind:

- eingeschränkter dynamischer Bereich, der durch die Belastbarkeit der Trenngele hervorgerufen wird
- die maximal einsetzbare Proteinmenge ist auf einen Bereich von  $\mu$ g bis mg Protein begrenzt [James P: Of genomes and proteomes, Biochem Biophys Res Commun, 1997, Feb 3, 231 (1), 1-6]
- Einschränkung des verwendeten Probenvolumens
- die Trennung ist auf zwei Dimensionen beschränkt
- die für die Trennung benötigten Ampholyte und das Gelmaterial Acryllamid können zu Artefakten führen und dadurch zu schwer erkennbaren Fehlinterpretationen beitragen
- Proteine, die in sehr hohen Konzentrationen vorhanden sind, ergeben relativ starke Signale und überdecken solche in niedrigen Konzentrationen vorhandene, so daß eine direkte Identifikation und Quantifizierung in diesem Falle nicht möglich ist
- der Verlust der nativen Konformation im denaturierenden Trenngel bedingt den Verlust der biologisch funktionellen Eigenschaften und erschwert die Identifikation der Proteine über die Bestimmung ihrer biologischen Eigenschaften, wie beispielsweise ihrer katalytischen Aktivität oder ihrer spezifischen Bindungseigenschaften
- die Sekundäranalyse, wie die häufig eingesetzte, spezifische Proteolyse einzelner Proteine, gefolgt von Massebestimmungen, macht einen schwer automatisierbaren Extraktionschritt aus dem Gel oder von der Blotmembran notwendig.

### 3. Identifikation der Proteine

Hierfür werden üblicherweise die Sequenzierung, die Massenanalyse und Schätzung des isoelektrischen Punkts aus der Laufstrecke im Gel sowie die Peptidfragmentmassenanalyse nach Isolierung aus dem Gel und tryptischem Verdau in der Massenspektrometrie eingesetzt [Shevchenko A et al.: Linking

genome and proteome by mass spectrometry: large-scale identification of yeast proteins from two dimensional gels, Proc Natl Acad Sci USA, 1996, Dec 10, 93 (25), 14440-5; Traini M et al.: Towards an automated approach for protein identification in proteome projects, Electrophoresis, 1998, Aug 19 (11), 1941-9]. Durch die verwendete Trenntechnik werden Merkmale, wie beispielsweise die katalytische Aktivität der Proteine und die native Konformation, nahezu vollständig ausgeschaltet und stehen nicht für die Identifikation zur Verfügung.

Die Vor- und Nachteile der bekannten Identifikationsverfahren sind insbesondere:

- Die Sequenzierung erfolgt durch Edman Abbau an automatisierten Einrichtungen und ist relativ kosten- und zeitaufwendig. Sie erfordert größere Mengen des Proteins. Deshalb ist sie trotz gegenwärtiger Weiterentwicklung für ein Massenscreening weniger geeignet [Gooley AA et al.: A role for Edman degradation in proteome studies, Electrophoresis, 1997, Jun 18(7), 1068-72]. Für die Identifizierung von primär unbekannten Proteinen ist dieser Analyseschritt allerdings in den meisten Fällen notwendig.
- Die Spezifität der Aussage der Massenbestimmung eines Proteins, die letztlich zu seiner Identifizierung führen soll, wird dadurch erhöht, daß man die Proteine nach der Trennung einem Proteaseverdau unterwirft, und die mittels Massenanalytik erhaltenen Informationen mit den aus der Primärstruktur vorhergesagten Massen der Peptidsequenzen nach dem tryptischen Verdau vergleicht. Im wesentlichen werden zwei Arten der Massenspektrometrie eingesetzt. Das sind erstens die Matrix assistierte Laserdesorptionsionisierungs - Massenspektrometrie (MALDI-MS) und zweitens die Electrospray Ionisierungs - Massenspektrometrie (ESI-MS) [Ducret A et al.: High throughput protein characterization by automated

reverse-phase chromatography/electrospray tandem mass spectrometry, Protein Sci, 1998, Mar 7 (3), 706-19; Parker KC et al.: Identification of yeast proteins from two-dimensional gels: working out spot cross-contamination, Electrophoresis, 1998, Aug 19 (11), 1920-32]. Die erste Methode hat den Vorteil, daß sie einen sehr großen Massebereich bis zu 1 Mio Dalton zu analysieren erlaubt und relativ robust durchführbar ist. Allerdings kann sie nur diskontinuierlich durchgeführt werden. Die ESI-Technik hingegen kann quasi kontinuierlich an Trenntechniken angeschlossen werden und zeigt gegenwärtig einen starken Zuwachs sowohl in der Entwicklung der Applikationsbreite als auch hinsichtlich der technologischen Möglichkeiten. Die enormen Fortschritte, die in den letzten Jahren mit beiden Techniken erreicht wurden, erlauben Massenauflösungen bis zur Isotopenverteilung, also Auflösungen kleiner 1 Dalton. Damit wird ein Massenspektrum von Peptidfragmenten nach sequenzspezifischen, definiertem Proteaseverdau oder einer anderen definierten Spaltung der Proteine erhalten. Dieses Spektrum ist typisch für jedes Protein und wird zur Proteinidentifizierung in Sequenzdatenbanken von Proteinen und Expressed Sequence Tag Banken eingesetzt. Da die Identifikation des Proteins durch die präzise Identifikation der vorhergesagten Peptide nach Proteaseverdau zustande kommt, stört jede posttranskriptionale Modifikation der Proteine, beispielsweise durch Glykosylierung, die Erkennung. Darüber hinaus können Fragmentierungsspektren der einzelnen Peptide im Massenspektrometer Informationen über die Aminosäuresequenz der Peptide liefern. Diese Sequenzinformation kann allein oder zusammen mit den anderen bekannten Daten des Proteins zu dessen Identifizierung in einer Sequenzdatenbank genutzt werden. Dieses Verfahren zur Sequenzanalyse ist gegenwärtig auf Grund der Schwierigkeiten einer korrekten Dateninterpretation noch nicht im

Routineeinsatz. Die Grenzen der Proteinidentifizierung durch massenspektrometrische Methoden bestehen in der nicht vollständigen Erfassung aller Proteinsequenzen in den vorhandenen Datenbanken.

#### 4. Datenanalyse

Die erhaltenen Charakteristika der einzelnen detektierten Proteine aus der Trennung in der 2-D- Elektrophorese, wie die Quantität, isoelektrischer Punkt und Größe, die Daten zur Proteinidentifizierung aus weiteren Schritten, beispielsweise der Sequenzierung oder Massenspektrometrie, werden zusammengeführt. Hieraus ergibt sich das Bild der Gesamtheit der Proteine mit ihrer Identität und Quantität in dem jeweiligen Proteom.

Der Erfindung liegt die Aufgabe zu Grunde, die Quantifikation und Identifikation der Proteine eines Proteoms zu verbessern, zu erleichtern und für bestimmte Proteine überhaupt erst zu ermöglichen.

Erfindungsgemäß werden die Proteine des Proteoms unter standardisierten Bedingungen einer Vielzahl  $n$  verschiedener Trennverfahren derart unterworfen, daß jeweils jede der in einem Trennschritt erhaltenen  $m_1$  flüssigen Fraktionen in einem darauf folgenden Trennschritt  $m_2$  flüssige Fraktionen liefert, wobei nach  $n$  Trennschritten  $m_1 * m_2 * \dots * m_n = M$  flüssige Fraktionen vorliegen, die mit  $r$  verschiedenen Analyseverfahren qualitativ und/oder quantitativ durch an sich bekannte Identifikationsverfahren identifiziert und durch ebenfalls an sich bekannte Quantifikationsverfahren quantitativ bestimmt werden, so daß nach Zusammenfügen der Analysedaten ein  $n$ -dimensionales Abbild des Proteoms, charakterisiert durch Identifikatoren und Quantifikatoren sowie durch die Lage im  $n$ -dimensionalen Datenraum, gewonnen wird.

In den Unteransprüchen 2-12 sind vorteilhafte Ausführungsformen des Verfahrens aufgeführt.

Mit dem erfindungsgemäßen Verfahren ist die enge Mengenlimitation durch die Belastbarkeit der bisher verwendeten 2-D-Elektrophorese nicht mehr gegeben. Es sind Proteinmengen im Bereich einiger Gramm einsetzbar. Die Trennmatrices sind mehrfach nutzbar. Hierdurch ist eine höhere Reproduzierbarkeit der Ergebnisse erzielbar. Das eingesetzte Probenmaterial liegt in der flüssigen Phase vor und ist somit anschließenden Analyseschritten unmittelbar zugänglich. Durch den besseren Erhalt der nativen Eigenschaften während der Trennung sind analytische Verfahren, wie die Aktivitätsbestimmung, und immunologische Verfahren, die auf der nativen Konformation des Analyten beruhen, möglich. Die Trennung von Analyten mit gleichen Ladungs- und Größeneigenschaften ist in der meist verwendeten 2-D-Elektrophorese nicht möglich. Durch den Einsatz von mindestens einem weiteren Charakteristikum, wie beispielsweise der Hydrophobizität des Analyten, zur Trennung entfällt allerdings diese Einschränkung.

Die Proben stehen in den Fraktionen nach der Trennung auch weiteren präparativen Arbeiten zur Verfügung.

Die Erfindung soll nachstehend anhand eines in der Zeichnung dargestellten Ausführungsbeispiels näher erläutert werden.

Es zeigen:

Fig. 1: Trennung von 1000 Proteinen in drei Dimensionen

Fig. 1a: Fraktionen 1 bis 33

Fig. 2a: Fraktionen 33/34 bis 67

Fig. 3a: Fraktionen 68 bis 100

Fig. 2: Graphische dreidimensionale Darstellung der Fraktionen gemäß Fig. 1

Als Ausführungsbeispiel sollen 1000 Proteine durch drei Eigenschaften A, B, C beschrieben werden. Diese Eigenschaften können zum Beispiel Größe, Ladung und Hydrophobizität sein. Die Eigenschaften sind in den Proteinen zufällig verteilt. Alle Proteine sind fortlaufend nummeriert. Hierauf erfolgt eine Trennung nach der Eigenschaft A (beispielsweise der Größe), bei der 100 Fraktionen a mit den entsprechenden Proteinen erhalten werden. Diese Fraktionen a werden nach der Eigenschaft B (beispielsweise der Ladung) in jeweils 10 Fraktionen b getrennt.

Jede dieser Fraktionen b wird einer Trennung nach der Eigenschaft C (beispielsweise der Hydrophobizität) unterworfen und liefert die Fraktionen c. Insgesamt werden  $100 \times 10 \times 10 = 10.000$  einzelne Fraktionen erhalten. Jedes durch die Trennung erhaltene Protein wird nach seinen Eigenschaften eindeutig einer der Fraktionen a, b, c zugeordnet. In der Aufstellung gemäß Fig. 1 sind die jeweiligen Fraktionen durch Zahlen bezeichnet. Hierbei sind die Fraktionen a der Eigenschaft A zugehörig. Sie teilen den möglichen Wertebereich der Eigenschaft A in jeweils einhundert gleiche Teile, d. h. für die Voraussetzung eines Wertebereichs von 0 bis 100 entspricht beispielsweise der Wert 1 dem Bereich 0 bis 1, der Wert 2 dem Bereich 1 bis 2, ..., der Wert 100 dem Bereich 99-100. Analog sind die möglichen Wertebereiche der Eigenschaften B und C in jeweils zehn gleiche Teile eingeteilt, d. h. beispielsweise der Wert 1 entspricht dem Bereich 1-10. Durchschnittlich jede zehnte Fraktion enthält ein Protein.

Aus der Zufallsbetrachtung ergibt sich die Möglichkeit von Mehrfachbesetzungen. In dem in der Aufstellung nach Fig. 1a-c aufgeführten Beispiel sind 39 Doppelbelegungen und eine Dreifachbelegung von Fraktionen enthalten.

Aus Platzgründen und der Übersicht halber sind die leeren 9.000 Fraktionen nicht dargestellt.

Fig. 1 enthält folgende tabellarische Auflistung:

Protein Nr.	Fraktionen a	Fraktionen b	Fraktionen c
----------------	-----------------	-----------------	-----------------

wobei in Fig. 1a die Fraktionen a = 1 bis 33, in Fig. 2a die Fraktionen a = 33/34 bis 67 und in Fig. 1c die Fraktionen a = 68 bis 100 aufgeführt sind.

Fig. 2 zeigt ein dreidimensionales Diagramm mit den Positionen der durch Proteine besetzten Fraktionen nach Fig. 1.

**Aufstellung der verwendeten Bezugszeichen**

A, B, C - Eigenschaft von Proteinen

a, b, c - Fraktion

## Patentansprüche

1. Verfahren zur mehrdimensionalen Analyse eines Proteoms, bei dem das biologische Material mit dem zu analysierenden Proteom aufgeschlossen und die zu dem Proteom gehörenden Proteine getrennt sowie quantitativ bestimmt und identifiziert werden, dadurch gekennzeichnet, daß die Proteine des Proteoms unter standardisierten Bedingungen einer Vielzahl  $n$  verschiedener Trennverfahren für  $n > 2$  derart unterworfen werden, daß jeweils jede der in einem Trennschritt erhaltenen flüssigen Fraktionen  $m_1$  in einem darauf folgenden Trennschritt  $m_2$  flüssige Fraktionen liefert, wobei nach  $n$  Trennschritten  $m_1 * m_2 * \dots * m_n = M$  flüssige Fraktionen vorliegen, die mit  $r$  verschiedenen Analyseverfahren qualitativ und/oder quantitativ durch an sich bekannte Identifikationsverfahren identifiziert und durch ebenfalls an sich bekannte Quantifikationsverfahren quantitativ bestimmt werden, so daß nach Zusammenfügen der Analysedaten ein  $n$ -dimensionales Abbild des Proteoms, charakterisiert durch Identifikatoren und Quantifikatoren sowie durch die Lage im  $n$ -dimensionalen Datenraum, gewonnen wird.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß als Trennverfahren Methoden, die nach der Größe der Proteine trennen, und/oder Methoden, die nach der Masse der Proteine trennen, und/oder Methoden, die nach der Ladung der Proteine trennen, und/oder Methoden, die nach der Hydrophobizität der Proteine trennen, und/oder Methoden, die nach der Form der Proteine trennen und/oder Methoden, die nach der Affinität der Proteine hinsichtlich spezifischer Liganden auch zu Antikörpern trennen, ausgewählt werden.

3. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß als Identifikationsverfahren Methoden zur Bestimmung spezifischer immunologischer Eigenschaften und/oder Bestimmungsmethoden spezifischer katalytischer Aktivität und/oder Bestimmungsmethoden zur chemischen Modifikation der Proteine des Proteoms eingesetzt werden.
4. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß als Quantifikationsverfahren Methoden der unspezifischen Bestimmung der Protein-Konzentration mit unterschiedlichen Empfindlichkeiten und/oder quantitative Bestimmungsmethoden zur Bestimmung spezifischer katalytischer Aktivitäten und/oder quantitative immunologische Methoden und/oder quantitative Bindungsassays ausgewählt werden.
5. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Identifikation einzelner Proteine des Proteoms direkt über die Massebestimmung der Proteine erfolgt.
6. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Identifikation einzelner Proteine des Proteoms nach Protease Verdau und Masseidentifikation der Fragmente erfolgt.
7. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß beim ersten Trennschritt die Fraktionen in einem zweidimensionalen Mehrfachgefäßsystem, vorzugsweise in der Art und mit der Grundfläche von Mikrotitrationsplatten gesammelt werden.
8. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß beim ersten Trennschritt die Fraktionen in einem definierten Raster, vorzugsweise im  $n * 96$  - fach Raster der Mikrotiterplattentechnologie gesammelt werden.

9. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß alle Identifikations- und Quantifikationsschritte in einem definiertem Raster, vorzugsweise dem  $n * 96$  - fach Raster, mit paßfahiger Liquidhandlingstechnik erfolgen.
10. Verfahren nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß alle Identifikations- und Quantifikationsschritte mit wenigstens vier zweidimensional angeordneten und simultan arbeitenden Pipettorkanälen erfolgt.
11. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die erste Dimension zur Trennung ein an sich bekannte hochauflösende Größenausschluß-, eine Ionenaustausch oder eine Hydrophobizitätschromatographie ist, daß die zweite Dimension durch parallele Trennung und Fraktionierung der Fraktionen der ersten Dimension nach einem anderen als dem für die erste Dimension verwendeten Trennprinzip erfolgt und daß jede weitere Trennung und Fraktionierung durch parallele Trenn- und Fraktioniermethoden mit den aus den jeweils vorhergehenden Trenn- und Fraktionierschritten erhaltenen Fraktionen erfolgt.
12. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Analysedaten für das n-dimensionale Abbild des Proteoms in einer Datenbank zusammengefaßt werden.

1/4

Prot. Nr.	Frak. a	Frak. b	Frak. c	373	6	10	4	236	14	3	3	4634	203	6	53	647	28	2	10
404	1	1	9	699	7	1	1	724	14	4	7	5403	202	6	53	242	28	4	8
218	1	3	3	508	7	1	8	151	14	6	7	385	20	8	5	757	28	5	7
970	1	4	1	480	7	1	9	275	14	7	1	316	20	10	10	450	28	6	3
777	1	4	10	582	7	1	10	304	14	7	6	70	21	1	3	707	28	9	2
325	1	5	1	531	7	1	10	726	14	7	10	24703	213	7	5	601	28	5	10
190	1	5	7	177	7	6	9	664	14	10	6	568	215	7	5	268	28	5	10
348	1	6	2	918	7	7	4	214	15	1	7	49044	215	5	5	463	29	1	6
459	1	6	4	239	8	1	6	525	15	1	10	56954	215	5	5	259	29	2	4
156	1	8	6	649	8	1	9	263	15	2	4	795	21	4	4	19	29	4	3
172	1	8	7	106	8	2	1	181	15	2	10	23	21	6	5	530	29	2	5
999	1	8	10	610	8	2	6	289	15	3	5	811	21	8	8	572	29	2	6
289	1	10	9	738	8	5	3	731	15	5	3	29	21	9	5	60	29	5	1
189	1	10	9	161	8	5	8	547	15	6	3	362	21	10	3	603	29	5	2
281	2	1	1	154	8	7	5	877	15	6	10	709	22	1	6	907	29	6	5
618	2	2	10	981	8	8	5	631	15	7	6	347	22	2	8	660	29	7	4
274	2	4	10	972	9	3	5	596	15	7	7	695	22	3	1	685	29	8	7
849	2	5	2	96	9	3	7	202	15	7	10	663	22	4	4	411	29	10	4
494	2	6	2	192	9	4	4	5354	15	9	5	597	22	4	7	829	29	10	5
81	2	7	3	694	9	6	5	1933	15	9	5	579	23	2	6	797	30	3	3
564	2	10	2	691	9	6	5	800	16	1	7	614	23	2	10	383	30	3	6
670	2	10	4	952	9	6	8	187	16	1	8	434	23	3	9	600	30	3	8
562	3	1	8	68	9	8	1	560	16	3	3	22	23	8	3	472	30	4	9
805	3	2	3	913	9	8	9	98	16	5	4	420	23	8	5	32	30	5	2
108	3	2	9	950	9	9	5	714	16	6	1	983	23	10	5	542	30	6	3
923	3	3	3	150	9	10	6	680	16	7	3	975	23	10	6	953	30	6	6
386	3	3	5	137	10	1	9	652	16	8	7	244	24	1	1	391	30	8	9
295	3	4	5	80	10	2	1	4545	16	8	8	688	24	2	2	171	30	10	4
36	3	7	1	969	10	4	1	3907	16	8	8	561	24	3	9	123	30	10	8
20	3	10	4	778	10	5	3	876	16	9	5	257	24	4	4	224	31	1	2
606	3	10	5	462	10	7	8	369	16	9	8	5	24	5	5	418	31	2	6
592	4	1	3	737	10	8	8	116	16	10	2	280	24	6	8	964	31	2	10
8	4	2	6	785	10	9	9	770	17	2	4	212	24	8	7	773	31	3	7
917	4	2	8	802	10	10	3	902	17	3	6	896	25	2	2	762	31	4	4
756	4	3	8	856	11	1	1	988	17	3	7	389	25	2	5	159	31	5	3
255	4	4	8	467	11	6	8	957	17	4	4	815	25	3	8	73	31	5	8
483	4	4	9	932	11	9	4	183	17	4	10	331	25	4	5	409	31	7	9
503	4	6	2	927	11	10	1	9462	17	5	10	589	25	6	8	783	31	8	7
991	4	6	9	326	11	10	8	4023	17	5	10	814	25	6	9	370	31	9	5
741	4	9	8	594	11	10	9	823	17	5	7	816	25	7	2	874	31	10	4
507	4	10	7	523	12	2	7	593	17	9	1	67	25	7	4	733	32	1	10
69	5	1	4	519	12	3	7	977	18	3	8	845	25	7	10	100	32	2	4
584	5	2	4	297	12	4	5	221	18	6	2	890	25	9	5	502	32	2	9
26	5	2	10	447	12	4	7	498	18	6	4	104	25	9	8	381	32	3	1
771	5	3	4	238	12	8	3	7523	18	6	7	491	25	10	4	786	32	3	10
515	5	3	10	605	12	8	5	996	18	8	3	568	26	1	8	638	32	4	5
188	5	5	6	558	12	8	8	438	18	8	7	379	26	2	6	859	32	4	6
566	5	6	5	1605	12	8	5	521	18	9	9	909	26	3	8	599	32	5	8
478	5	7	9	987	12	10	3	968	18	10	2	687	26	4	8	546	32	5	10
529	5	8	10	191	12	10	9	735	18	10	10	105	26	5	1	871	32	7	7
149	5	8	10	866	13	1	6	90	19	1	4	858	26	6	5	118	32	9	6
627	5	8	7	997	13	2	6	443	19	1	7	827	26	6	8	622	32	9	10
729	5	9	4	852	13	2	9	361	19	2	10	798	26	7	10	607	32	10	7
956	5	9	8	142	13	3	5	3	19	3	8	769	27	1	5	84	33	1	3
832	5	10	4	613	13	4	6	436	19	3	10	976	27	3	1	83	33	3	1
897	5	10	5	338	13	5	4	662	19	6	4	415	27	3	6	939	33	3	2
792	5	10	10	6905	13	5	6	79	19	8	3	296	27	3	10	925	33	4	7
350	6	1	6	985	13	5	6	273	19	9	6	921	27	4	1	16	33	5	3
360	6	3	2	669	13	6	1	403	19	9	8	99	27	4	6	653	33	5	4
423	6	3	9	903	13	7	1	493	19	10	1	851	27	4	8	208	33	6	3
875	6	4	1	656	13	7	8	524	19	10	2	240	27	5	9	567	33	7	2
82	6	5	2	537	13	8	10	914	19	10	4	519	27	8	2	194	33	8	1
578	6	5	8	779	13	9	8	246	20	1	1	766	27	8	5	58	33	8	2
487	6	7	6	708	14	1	6	272	20	3	1	51	27	8	7	499	33	9	10
363	6	8	1	333	6	9	9	985	20	6	2	451	27	8	9	198	33	8	10
				141	14	2	8	841	20	6	3	581	27	9	6	700	33	9	3

Fig. 1a

2/4

869	33	10	3	979	41	3	5	938	48	5	10	743	55	5	7	834	62	4	2
526	34	3	3	556	41	4	9	512	48	5	10	305	55	6	8	471	62	4	3
332	34	3	4	44	41	5	3	485	48	5	10	473	55	8	1	919	62	4	10
636	34	4	6	812	41	7	8	915	48	7	5	266	55	8	4	342	62	7	3
121	34	4	8	37	41	9	6	458	48	7	10	393	55	8	10	460	62	7	8
998	34	5	1	343	41	10	8	488	48	7	10	320	55	9	1	378	62	7	10
355	34	5	8	911	42	1	6	120	48	7	10	276	55	9	6	94	62	10	7
346	34	5	10	522	42	1	10	868	48	8	3	799	55	10	9	935	63	1	7
270	34	6	1	505	42	3	1	486	48	10	10	518	56	1	10	395	63	2	4
810	34	6	2	417	42	3	2	30	49	1	6	245	56	2	6	464	63	2	8
34	34	6	9	782	42	4	3	571	49	2	1	870	56	4	5	949	63	3	2
734	34	7	1	807	42	5	7	936	49	3	10	940	56	5	3	394	63	4	1
862	34	7	6	765	42	6	3	520	49	6	10	673	56	5	6	14	63	4	6
164	34	9	4	168	42	8	1	775	49	8	4	182	56	5	10	683	63	6	4
157	34	10	8	857	42	8	9	421	49	8	6	287	50	1	1	298	63	6	10
796	35	1	6	657	42	9	1	89	50	3	3	89	56	8	1	698	63	7	5
962	35	1	8	252	42	10	1	847	50	3	7	679	56	8	1	920	63	5	10
736	35	3	4	475	42	10	3	49	50	5	8	78	56	8	4	483	63	5	10
85	35	3	8	173	42	10	4	577	50	6	7	437	56	8	8	817	63	8	8
47	35	4	2	302	43	2	3	2	50	7	5	873	56	9	6	76	63	8	9
793	35	4	6	809	43	2	10	374	50	7	7	888	56	10	5	416	63	8	10
819	35	6	6	431	43	4	3	711	50	8	9	201	57	1	7	371	63	9	3
671	35	6	8	906	43	5	10	722	50	9	1	133	57	5	9	739	63	9	5
432	35	6	10	602	43	7	6	958	50	10	4	908	57	6	2	646	63	9	6
195	35	9	1	283	43	7	6	645	51	1	6	967	57	6	3	135	63	9	7
324	35	9	4	492	43	9	4	720	51	2	1	12	57	7	7	233	63	9	10
658	35	10	3	349	43	9	7	300	51	2	3	674	57	7	5	237	64	1	4
468	36	2	1	364	43	10	7	973	51	6	4	722	57	5	7	764	64	4	3
643	36	4	2	197	43	10	9	282	51	6	10	352	58	1	9	297	64	4	3
926	36	5	8	465	44	2	1	674	51	7	7	293	58	2	10	745	64	6	5
693	36	8	7	549	44	2	4	213	51	9	4	543	58	9	3	248	64	6	6
767	36	9	3	635	44	3	9	833	51	9	10	954	58	10	2	585	64	6	9
354	36	10	7	538	44	5	6	216	51	10	4	681	59	2	1	466	64	9	2
955	37	1	1	801	44	6	6	986	52	1	3	844	59	2	9	217	64	9	5
314	37	4	4	993	44	6	7	253	52	2	8	753	59	3	2	730	64	9	8
548	37	5	8	965	44	7	6	625	52	2	9	881	59	5	2	761	64	10	6
313	37	6	10	780	44	8	2	768	52	3	6	52	59	5	3	569	64	10	8
219	37	7	4	830	44	9	2	818	52	3	7	501	59	5	8	750	65	1	3
959	37	8	5	277	44	9	5	804	52	6	1	516	59	6	3	38	65	2	4
46	37	9	2	269	44	9	7	824	52	6	5	196	59	6	7	102	65	3	8
497	38	1	2	113	45	1	1	705	52	7	6	860	59	7	7	880	65	4	8
678	38	3	5	265	45	1	3	615	53	1	3	628	59	8	10	528	65	5	1
260	38	3	8	710	45	1	6	261	53	1	8	162	59	10	1	725	65	7	10
754	38	3	9	477	45	2	1	639	52	9	7	54	59	10	8	787	65	8	1
648	38	4	7	922	45	2	6	204	52	9	10	291	60	2	5	533	65	9	1
110	38	5	10	668	45	4	2	284	52	10	7	553	60	2	7	408	65	9	8
209	38	6	10	271	45	4	7	615	53	1	3	655	60	2	9	882	66	1	2
990	38	6	7	863	45	6	2	261	53	1	8	165	60	8	1	264	66	1	5
11	38	8	10	39	45	7	5	612	53	6	6	199	60	8	2	87	66	1	6
941	38	9	5	948	45	7	9	604	53	10	3	210	60	10	2	429	66	2	5
184	38	9	8	376	46	1	5	15	53	10	7	442	60	10	6	367	66	3	5
637	39	1	8	428	46	5	5	441	53	10	8	728	60	10	9	789	66	3	8
545	39	2	7	317	46	8	1	843	54	1	3	633	61	1	1	328	66	4	9
163	39	7	9	117	46	9	6	97	54	1	6	570	61	1	4	960	66	6	3
267	39	8	8	689	47	1	5	235	54	4	1	220	61	1	6	640	66	8	8
1	39	9	6	992	47	2	4	583	54	6	10	179	61	5	5	794	66	9	1
229	39	10	1	559	47	2	6	583	54	6	10	808	61	7	8	452	67	1	5
53	39	10	4	375	47	3	10	24	54	8	2	223	61	9	2	500	67	1	8
822	40	1	3	554	47	5	4	576	54	8	10	336	62	1	10	510	67	3	6
891	40	1	7	624	47	6	6	160	55	1	10	232	62	2	6	10	67	5	2
335	40	3	6	565	47	6	6	410	55	2	1	77	62	2	8	650	67	6	3
623	40	4	2	457	47	9	3	929	55	2	4	399	62	2	10	490	67	6	9
901	40	5	8	17	47	10	4	387	55	2	5	55	62	3	8	586	67	7	9
828	40	6	6	864	48	1	1	74	55	2	9	675	62	3	10	344	67	8	4
666	40	7	10	372	48	2	4	129	48	3	4	482	67	8	7	482	67	8	7
474	40	10	2	759	48	2	7												
704	40	10	3	129	48	3	4												

Fig. 1b

3/4

651	68	1	4
368	68	3	8
203	68	4	5
225	68	5	5
332	68	6	5
706	68	7	5
158	68	7	8
178	68	9	3
788	68	9	10
145	69	1	4
250	69	3	10
131	69	5	6
425	69	6	8
854	69	8	3
303	69	8	5
899	69	9	9
186	69	10	1
721	69	10	4
455	70	1	2
125	70	1	7
122	70	2	6
256	70	4	1
928	70	4	2
842	70	4	4
484	70	4	5
308	70	4	8
222	70	5	8
641	70	6	3
740	70	6	4
56	70	7	3
620	70	7	9
303	70	8	2
855	70	8	2
848	70	8	8
595	70	9	2
898	70	9	9
716	70	9	10
329	70	10	9
885	71	2	8
18	71	2	9
676	71	3	3
702	71	3	8
128	71	7	4
140	71	7	6
13	71	8	2
621	71	8	3
642	71	8	5
334	71	9	4
489	71	10	2
742	72	3	1
632	72	3	4
247	72	3	8
506	72	4	3
732	72	4	9
853	72	8	3
392	72	9	3
92	72	9	5
552	73	2	3
723	73	4	3
994	73	4	4
945	73	5	8
665	73	5	8
414	73	7	8
879	73	10	2
661	74	2	2
984	74	3	2
905	74	5	1
887	74	5	8
461	74	6	7
546	74	6	8
575	74	7	9
45	74	7	10
290	75	1	4
846	75	2	1
440	75	6	7
155	75	7	10
31	75	8	5
9	75	9	8
127	75	10	4
748	76	1	8
405	76	2	9
555	76	3	6
180	76	5	8
630	76	10	3
312	76	10	7
718	77	1	9
889	77	2	8
772	77	3	8
380	77	4	9
64	77	5	10
982	77	8	5
825	77	10	3
840	78	2	1
306	78	2	5
865	78	6	4
170	78	7	3
839	78	8	7
59	79	1	3
644	79	4	4
307	79	4	9
327	79	5	5
251	79	5	6
544	79	6	2
230	79	6	4
341	79	7	7
763	79	8	2
132	79	9	1
629	79	9	6
406	80	1	2
850	80	3	1
35	80	3	3
279	80	5	5
884	80	5	8
572	80	5	10
947	80	6	3
427	80	10	9
446	81	1	3
616	81	1	7
175	81	2	2
654	81	2	4
205	81	4	8
206	81	4	10
872	81	7	2
93	81	7	6
791	81	8	4
469	81	8	5
262	82	2	7
514	82	3	1
776	82	3	8
377	82	3	10
203	82	4	7
148	82	5	10
1000	82	6	5
900	82	6	8
413	82	6	10
110	82	8	5
551	83	1	2
439	83	1	9
445	83	3	1
353	83	3	2
294	83	3	3
883	83	3	10
580	83	7	2
715	83	8	3
4	83	8	4
931	83	8	6
590	83	10	5
323	83	10	8
63	84	5	2
989	84	6	5
152	84	8	9
207	84	9	2
806	84	10	2
111	84	10	7
513	85	1	2
527	85	1	10
109	85	2	7
95	85	3	8
315	85	3	9
130	85	4	6
241	85	5	5
601	85	7	3
504	85	8	4
944	85	10	9
755	86	1	1
534	86	1	5
307	86	4	9
751	86	3	5
667	86	3	8
48	86	5	2
258	86	5	6
107	86	6	8
358	86	8	2
820	86	8	4
254	86	9	1
971	86	9	4
496	86	9	8
701	86	10	7
659	87	1	5
943	87	1	8
894	87	2	5
517	87	3	3
176	87	5	5
322	87	5	10
878	87	6	4
243	87	7	8
821	87	7	9
836	87	8	2
942	87	9	6
174	87	10	2
937	88	1	3
626	88	5	1
684	88	6	8
609	88	7	2
826	88	9	5
88	89	2	1
330	89	3	5
790	89	4	1
388	89	4	8
588	89	6	5
228	89	6	6
838	89	7	5
456	89	8	2
435	89	8	7
479	89	10	5
980	90	1	2
424	90	1	3
837	90	4	5
143	90	4	10
57	90	5	2
144	90	6	6
430	90	7	7
319	90	8	2
400	90	8	4
951	90	8	7
719	90	9	10
345	90	10	3
366	90	10	8
749	90	10	10
1339	91	1	1
565	91	1	1
831	91	2	2
278	91	2	7
136	91	2	10
453	91	3	2
407	91	8	3
682	91	8	4
886	91	8	7
781	91	9	5
672	91	10	4
384	92	1	2
855	92	2	5
75	92	4	3
285	92	4	10
166	92	5	1
356	92	5	9
6	92	6	2
299	92	6	6
185	92	6	9
758	92	7	4
495	92	10	2
912	92	10	6
359	93	2	6
747	93	2	9
40	93	5	2
301	93	5	3
433	93	5	7
861	93	6	6
234	93	7	1
541	93	8	1
200	93	10	1
587	93	10	8
619	94	1	1
449	94	1	1
134	94	1	9
357	94	1	10
933	94	2	2
617	94	2	3
963	94	2	10
103	94	3	4
41	94	3	7
25	94	8	3
608	94	9	4
934	95	1	1
318	95	1	1
550	95	2	4

Fig. 1c

4/4

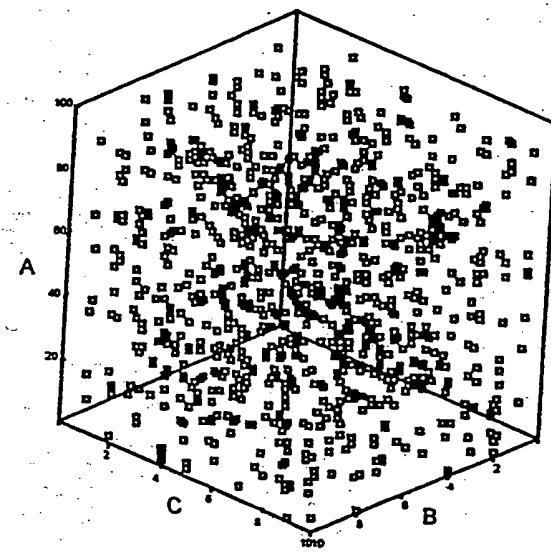


Fig. 2

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/DE 00/02154

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
IPC 7 G01N30/46

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
IPC 7 G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, PAJ, BIOSIS, SCISEARCH

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>MOORE A W ET AL: "COMPREHENSIVE THREE-DIMENSIONAL SEPARATION OF PEPTIDES USING SIZE EXCLUSION CHROMATOGRAPHY/REVERSED PHASE LIQUID CHROMATOGRAPHY/ OPTICALLY GATED CAPILLARY ZONE ELECTROPHORESIS" ANALYTICAL CHEMISTRY, US, AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, COLUMBUS, vol. 67, no. 19, 1 October 1995 (1995-10-01), pages 3456-3463, XP000535656 ISSN: 0003-2700 abstract; figures 1,4</p> <p style="text-align: center;">-/-</p>	1,2,11, 12



Further documents are listed in the continuation of box C.



Patent family members are listed in annex.

### \* Special categories of cited documents :

- \*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- \*E\* earlier document but published on or after the international filing date
- \*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- \*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- \*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

\*T\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

\*U\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

\*V\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

\*W\* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

1 December 2000

Date of mailing of the international search report

08/12/2000

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Zinngrebe, U

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Intern. Application No  
PCT/DE 00/02154

## C(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>OPITECK G J ET AL: "COMPREHENSIVE TWO-DIMENSIONAL HIGH-PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY FOR THE ISOLATION OF OVEREXPRESSED PROTEINS AND PROTEOME MAPPING"  ANALYTICAL BIOCHEMISTRY, ACADEMIC PRESS, SAN DIEGO, CA, US, vol. 258, no. 2, 1 May 1998 (1998-05-01), pages 349-361, XP000960771  ISSN: 0003-2697  cited in the application  abstract  page 351 -page 352</p> <p>-----</p>	1
A	<p>DUCRET A ET AL: "HIGH THROUGHPUT PROTEIN CHARACTERIZATION BY AUTOMATED REVERSE-PHASE CHROMATOGRAPHY/ELECTROSPRAY TANDEM MASS SPECTROMETRY"  PROTEIN SCIENCE, CAMBRIDGE UNIVERSITY PRESS, CAMBRIDGE, GB, vol. 7, no. 1, 7 March 1998 (1998-03-07), pages 706-719, XP000965234  ISSN: 0961-8368  cited in the application  abstract; figure 1</p> <p>-----</p>	1
A	<p>BLACKSTOCK W P ET AL: "Proteomics: quantitative and physical mapping of cellular proteins"  TRENDS IN BIOTECHNOLOGY, NL, ELSEVIER, AMSTERDAM, vol. 17, no. 3, March 1999 (1999-03), pages 121-127, XP004157732  ISSN: 0167-7799  page 122 -page 124</p> <p>-----</p>	1
A	<p>LOPEZ M F: "Proteome analysis - I. Gene products are where the biological action is"  JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY B: BIOMEDICAL APPLICATIONS, NL, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, vol. 722, no. 1-2, 5 February 1999 (1999-02-05), pages 191-202, XP004156213  ISSN: 0378-4347  page 198</p> <p>-----</p>	1

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE 00/02154

A. KLASIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES  
IPK 7 601N30/46

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

## B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprästoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)  
IPK 7 601N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprästoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, PAJ, BIOSIS, SCISEARCH

## C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	<p>MOORE A W ET AL: "COMPREHENSIVE THREE-DIMENSIONAL SEPARATION OF PEPTIDES USING SIZE EXCLUSION CHROMATOGRAPHY/REVERSED PHASE LIQUID CHROMATOGRAPHY/ OPTICALLY GATED CAPILLARY ZONE ELECTROPHORESIS" ANALYTICAL CHEMISTRY, US, AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, COLUMBUS, Bd. 67, Nr. 19, 1. Oktober 1995 (1995-10-01), Seiten 3456-3463, XP000535656 ISSN: 0003-2700 Zusammenfassung; Abbildungen 1,4</p> <p>---</p> <p>-/-</p>	1,2,11, 12

<input checked="" type="checkbox"/>	Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen	<input type="checkbox"/>	Siehe Anhang Patentfamilie
* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen		*T*	Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist
*A* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist		*X*	Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden
*E* älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist		*Y*	Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist
*L* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)		*&*	Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist
*O* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht			
*P* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist			

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche	Absendedatum des internationalen Recherchenberichts
1. Dezember 2000	08/12/2000
Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl Fax (+31-70) 340-3016	Bevollmächtigter Bediensteter Zinngrebe, U

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internales Aktenzeichen  
PCT/DE 00/02154

## C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	OPITECK G J ET AL: "COMPREHENSIVE TWO-DIMENSIONAL HIGH-PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY FOR THE ISOLATION OF OVEREXPRESSED PROTEINS AND PROTEOME MAPPING" ANALYTICAL BIOCHEMISTRY, ACADEMIC PRESS, SAN DIEGO, CA, US, Bd. 258, Nr. 2, 1. Mai 1998 (1998-05-01), Seiten 349-361, XP000960771 ISSN: 0003-2697 in der Anmeldung erwähnt Zusammenfassung Seite 351 -Seite 352	1
A	DUCRET A ET AL: "HIGH THROUGHPUT PROTEIN CHARACTERIZATION BY AUTOMATED REVERSE-PHASE CHROMATOGRAPHY/ELECTROSPRAY TANDEM MASS SPECTROMETRY" PROTEIN SCIENCE, CAMBRIDGE UNIVERSITY PRESS, CAMBRIDGE, GB, Bd. 7, Nr. 1, 7. März 1998 (1998-03-07), Seiten 706-719, XP000965234 ISSN: 0961-8368 in der Anmeldung erwähnt Zusammenfassung; Abbildung 1	1
A	BLACKSTOCK W P ET AL: "Proteomics: quantitative and physical mapping of cellular proteins" TRENDS IN BIOTECHNOLOGY, NL, ELSEVIER, AMSTERDAM, Bd. 17, Nr. 3, März 1999 (1999-03), Seiten 121-127, XP004157732 ISSN: 0167-7799 Seite 122 -Seite 124	1
A	LOPEZ M F: "Proteome analysis - I. Gene products are where the biological action is" JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY B: BIOMEDICAL APPLICATIONS, NL, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, Bd. 722, Nr. 1-2, 5. Februar 1999 (1999-02-05), Seiten 191-202, XP004156213 ISSN: 0378-4347 Seite 198	1

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**